

猪瘟病毒囊膜蛋白 E2 基因真核分泌型表达载体的构建及其表达

徐彦召,张彦明,何雷,唐青海,代晨,王静,杨小云

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】构建猪瘟病毒囊膜蛋白(E2 protein)基因的真核表达载体,并将其在猪脐静脉血管内皮细胞中进行表达。【方法】采用 PCR 技术扩增出 E2 蛋白全长基因(E2qc)序列和去除跨膜基因(E2sh)序列,并将其克隆入真核表达载体 pSec Tag2(A)中,构建 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 表达载体,分别进行 PCR、双酶切及测序鉴定。用脂质体法将阳性克隆瞬时转染猪脐静脉血管内皮细胞,对转染细胞进行 RT-PCR 检测目的基因的转录情况,同时对转染细胞及细胞上清液进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析,以检测目的蛋白的表达情况。【结果】成功克隆了 E2 蛋白基因全长序列 1 119 bp 和去除 E2 蛋白跨膜基因序列 999 bp 的目的基因。构建的表达载体经 PCR、双酶切法及测序鉴定均无误。转染后细胞的 RT-PCR 结果显示,目的基因被成功转录。转染后细胞及细胞上清液的 SDS-PAGE 和 Western-blot 结果显示,目的基因被成功表达。【结论】成功构建了猪瘟病毒 E2 蛋白的真核表达载体,转染猪脐静脉血管内皮细胞后,分泌表达了猪瘟病毒 E2 重组蛋白。

【关键词】 猪瘟病毒囊膜蛋白;猪脐静脉血管内皮细胞;分泌型真核表达载体;真核表达

【中图分类号】 S852.65⁺1;Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)05-0007-05

Construction of eukaryotic expression vector of CSFV E2 genes and its secretory expression

XU Yan-zhao, ZHANG Yan-ming, HE Lei, TANG Qing-hai,
DAI Chen, WANG Jing, YANG Xiao-yun

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】CSFV envelope protein genes were subcloned into a eukaryotic expression vector which could make the protein secret into medium, and then swine umbilical vein endothelial cell(SUVECs) was used to express this protein. 【Method】CSFV E2 full-length genes (E2qc) and E2 genes without transmembrane sequence(E2sh) were amplified from plasmid pMD19T-E2 by PCR, then the two genes were subcloned into pSec Tag 2(A); PCR digestion and sequencing were used to identify positive plasmid; the identified recombinant plasmid was transiently transfected into SUVECs by Lipofectamine 2000 and expression products in SUVECs were determined by RT-PCR, SDS-PAGE and Western blot. 【Result】The fragments of E2 full-length genes and E2 genes without transmembrane sequence were examined by 10 g/L agarose electrophoresis consistent with predicted size. PCR digestion and sequencing showed that the recombinant plasmids were accurate; E2 protein expressing in SUVECs was confirmed by RT-PCR and Western-blot. The results showed that the E2 protein was secreted into the medium. 【Conclusion】Recombinant

* [收稿日期] 2008-07-10

[基金项目] 国家“863”重大项目课题“家畜重要病毒病基因工程疫苗研究与创制”(2006AA10A204)

[作者简介] 徐彦召(1984—),男,河南许昌人,在读硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。

[通信作者] 张彦明(1956—),男,陕西南郑人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。

Email: ylzhangym@sohu.com

plasmid pSec Tag-E2 containing CSFV envelope protein genes was successfully constructed, and E2 protein made secretory expression in SUVECs.

Key words: classical swine fever virus envelope protein; SUVECs; recombinant plasmid; secretory expression

猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV)是猪瘟(Classical swine fever, CSF)的病原体。其在分类上属于黄病毒科(Flaviridae)瘟病毒属(*Pestivirus*)。CSFV 囊膜蛋白 E2 是诱导产生保护性中和抗体的主要抗原结构蛋白,其长度为 1 119 bp,编码 373 个氨基酸,其中后 40 个氨基酸是其的跨膜区,决定了其膜表达效应^[1]。

自 20 世纪 50 年代以来,我国研制成功的猪瘟疫兔化弱毒疫苗控制了猪瘟的大规模流行,但近年来猪瘟流行又呈现出了新的特点,非典型猪瘟迅速蔓延,加大传统弱毒疫苗的注射剂量已不能完全控制其流行^[2]。因此,研制猪瘟新型疫苗已成为当务之急。国外有研究表明,用表达的 CSFV 蛋白免疫猪后,能抵抗强毒攻击,获得完全保护,且目前国外已经有商品化的 CSF 亚单位疫苗问世^[3-5]。近年来,国内在这方面也进行了研究,但到目前为止,还未见商品化的基因工程疫苗。

有研究表明,囊膜蛋白 E2 是 CSFV 主要的保护性抗原蛋白,用其单独免疫即可保护猪不发生猪瘟,而且 E2 蛋白上的中和表位在猪瘟疫病毒毒株中是保守的^[6]。有研究表明,在 E2 蛋白基础上开发的亚单位疫苗,不仅会对 CSFV 野毒株产生保护,而且很容易通过检测抗 Erns 抗体将免疫接种猪和自然感染猪区分开^[7]。本研究以 CSFV E2 基因全长为模板,构建包含 CSFV E2 全部氨基酸序列及去除 E2 蛋白跨膜序列的分泌型真核表达重组质粒,用猪脐静脉内皮细胞(wine umbilical vein endothelial cell, SUVECs)进行表达,对表达产物进行 SDS-Page、Western-blot 分析,以期对 CSFV 亚单位疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞和试剂 大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、pSec Tag2(A)载体、含猪瘟 E2 基因的质粒 pMD 19T-E2、永生化猪脐静脉血管内皮细胞,由西北农林科技大学预防兽医学实验室建立或保存;M-MLV 反转录酶、核酸内切酶、T4 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司;LipofectamineTM 2000

、Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;质粒小量提取试剂盒购自百泰克公司;胶回收试剂盒为上海生物工程技术有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 血清、细胞培养基及抗体 胎牛血清购自杭州四季青公司,高糖的 DMEM 干粉为 Gibco 公司产品,猪瘟阳性血清由西北农林科技大学预防兽医学实验室建立或制备和保存,辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 为北京博奥森公司产品。

1.1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 中公布的 CSFV Shimen 株基因序列(AF092448),利用 Primer 5.0 引物分析软件,分别设计 P1/P2、P1/P3 2 对引物(表 1, P1~P3 中的斜体分别为 *Kpn* I、*Xho* I、*Eco*R I 酶切位点序列),其中 P1/P2 用于扩增 CSFV E2 基因全长(E2qc)序列, P1/P3 用于扩增 E2 基因去除跨膜区的基因(E2sh)序列。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

表 1 试验用的 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	核苷酸序列 Nucleotide sequence
P1	5'-TATGGTACCCGGCTAGCCTGCAAGG-3'
P2	5'-ATTCTCGAGACCAGCGCGAGTTGT-3'
P3	5'-AAAGAATTCGTCTGTCTCAGTCCAGGTCAAAC-3'

1.2 CSFV E2 基因全长序列及 E2 基因去除跨膜区基因序列的 PCR 扩增

以 pMD19T-E2 为模板,分别以 P1/P2、P1/P3 为引物,扩增 E2 基因全长序列及 E2 基因去除跨膜区的基因序列。PCR 反应体系:pMD 19T-E2 1 μ L,上、下游引物(25 μ mol/L)各 1 μ L, dNTP(10 mmol/L)1 μ L, 10 \times Buffer 2 μ L, *Taq* 酶(2 U/ μ L)1 μ L, 灭菌双蒸水 13 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 循环 35 次;最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 CSFV E2 基因全长及 E2 基因去除跨膜区序列重组载体的构建

取 PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定,并纯化回收。将回收后的 E2 基因全长序列及 E2 基因去除跨膜区的基因序列,分别用 *Kpn* I / *Xho* I、*Kpn* I / *Eco*R I 进行双酶切纯化回收目的片

段。用 T4 连接酶将回收的目片段分别和经同样双酶切处理的 pSec Tag2(A)载体连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。经蓝白斑和 Amp 抗性筛选后提取质粒,分别用 *Kpn* I / *Xho* I、*Kpn* I / *Eco*R I 进行双酶切鉴定及 PCR 鉴定,并送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序。鉴定为阳性的质粒分别命名为 pSec Tag-E2qc(E2 基因全长序列)和 pSec Tag-E2sh(E2 基因去除跨膜区序列)。

1.4 重组质粒转染猪血管内皮细胞

将永生化猪脐静脉血管内皮细胞培养于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液中,转染前 1 d 均匀铺于 6 孔板,每孔约 5×10^5 。分别对 pSec Tag-E2qc、pSec Tag-E2sh 以及 pSec Tag2(A)空载体(对照)进行纯化。细胞传代 24 h 后(细胞铺满皿底约 70%),按照 LipofectamineTM 2000 试剂盒说明书,分别将上述纯化的质粒 DNA 和脂质体加入无抗生素、无血清的双无 DMEM 培养液中混匀,静置 10 min。然后将两溶液混匀,室温静置 30 min。用双无 DMEM 培养液将培养板中的培养孔清洗 2 次,加入 800 μ L 双无 DMEM 培养液。将脂质体/DNA 混悬液逐滴加入培养板,轻轻混匀,置于体积分数 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件 孵育 6 h 后,置换新鲜的 DMEM 培养液继续培养,表达 48 h 后,分别收集培养细胞及上清液。

1.5 转染 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 细胞 RT-PCR 检测目的基因的转录

将转染后收集的培养细胞加入 200 μ L TRIzol Reagent 试剂中裂解 10 min;加入 0.2 mL 氯仿,振荡 15 s,静置 2 min;于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液;加入 0.5 mL 预冷的异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温静置 10 min;于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;加入 1 mL 体积分数 75% 的乙醇,置 -20 $^{\circ}$ C 保存。将保存于 75% 乙醇的 RNA,于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min,弃乙醇,室温干燥 10 min,加入 20 μ L 无 RNase 水溶解 5 min (50~55 $^{\circ}$ C),取 13 μ L 总 RNA,75 $^{\circ}$ C 变性 8 min,迅速冰浴 5 min,然后依次加入 1.5 μ L 高效 RNase 灭活剂(RNasefree)、1.5 μ L 反转录引物(25 μ mol/L)、1.5 μ L dNTP (10 mmol/L)、5 μ L 5 \times Buffer、1.5 μ L 灭菌三蒸水(焦碳酸二乙酯(DEPC)处理),瞬时离心,60 $^{\circ}$ C 作用 15 min;迅速冰浴 5 min,再加入 1 μ L M-MLV 反转录酶(2 000 U/ μ L),瞬时离心,42 $^{\circ}$ C 作用 1 h,95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存作为下一步 PCR 反应的模板。PCR 反应体系为:逆转录产物 2

μ L,上、下游引物(25 μ mol/L)各 1 μ L,dNTP(10 mmol/L)1 μ L,10 \times Buffer 2 μ L,*Taq* 酶(2 U/ μ L)1 μ L,灭菌双蒸水 12 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 重组质粒表达 CSFV E2 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

将收集的转染后细胞,用 Western-blot 专用的细胞裂解液裂解,分别取细胞裂解产物和转染细胞上清液 80 μ L,加入 5 \times Loading buffer 20 μ L,充分悬浮,100 $^{\circ}$ C 沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 30 s,用 120 g/L 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离,然后电转至硝酸纤维膜上,用体积分数 5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭后用一抗(猪瘟阳性血清)和二抗(辣根过氧化物酶标记的兔抗猪的 IgG)孵育,3,3'-四盐酸二氨基联苯胺(DAB)避光显色 10 min。

2 结果与分析

2.1 CSFV E2 基因全长序列及 E2 基因去除跨膜区基因序列的扩增

用 P1/P2 引物扩增出 CSFV E2 基因全长序列(1 119 bp),用 P1/P3 引物扩增出了 CSFV E2 基因去除跨膜区序列(999 bp)(图 1)。

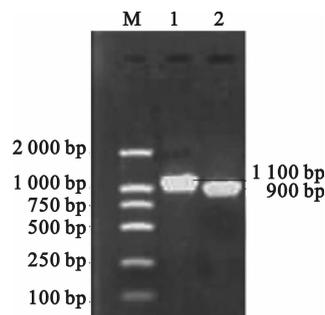


图 1 CSFV E2 基因全长序列和去除跨膜区基因序列的 PCR 扩增结果

M. DL2000;1. E2 全长的 PCR 产物;2. E2 去除跨膜区的 PCR 产物

Fig. 1 PCR results of CSFV E2qc and E2sh

M. DNA Marker DL 2 000;1. PCR products of E2qc;

2. PCR products of E2sh

2.2 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 重组载体的构建与鉴定

将构建的 pSec Tag-E2qc 重组载体用 *Kpn* I / *Xho* I 进行双酶切和 PCR 鉴定,均得到了 1 119 bp 的目的条带;将构建的 pSec Tag-E2sh 重组载体用 *Kpn* I / *Eco*R I 进行双酶切和 PCR 鉴定,均得到了 999 bp 的目的条带(图 2)。测序结果显示,目的序

列与标准序列一致。表明载体构建成功。

2.3 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 转染细胞的 RT-PCR 扩增

分别从 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 转染的猪脐静脉血管内皮细胞中提取总 RNA,以其为模

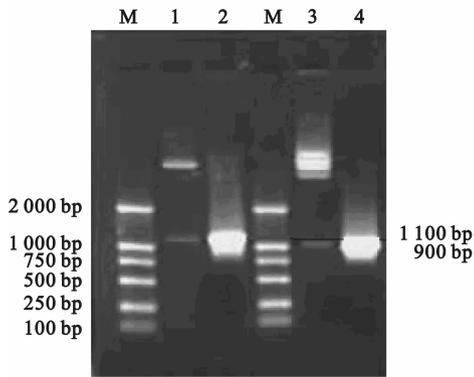


图 2 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定

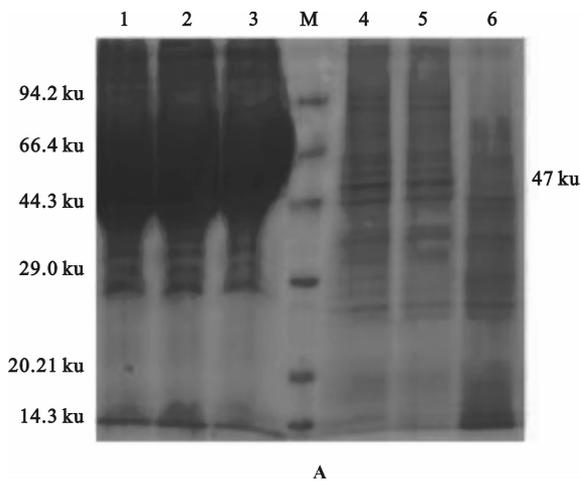
M. DL2000;1. pSec Tag-E2qc 的 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切鉴定; 2. pSec Tag-E2qc 的 PCR 鉴定;3. pSec Tag-E2sh 的 *Kpn* I / *Eco*R I 双酶切鉴定;4. pSec Tag-E2sh 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pSec Tag-E2qc and pSec Tag-E2sh

M. DL 2 000 Marker;1. pSec Tag-E2qc *Kpn* I / *Xho* I ; 2. PCR products of E2qc;3. pSec Tag -E2sh *Kpn* I / *Eco*R I ; 4. PCR products of pSec Tag -E2sh

2.4 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测

SDS-PAGE(图 4-A)和 Western-blot(图 4-B)结果显示,构建的 2 个重组质粒均在细胞中成功表



A

达 E2 蛋白,但仅有去除 E2 蛋白跨膜序列的重组质粒,能够将表达的目的蛋白分泌到细胞培养上清液中。pSec Tag2(A)空载体(对照)无目的条带出现。

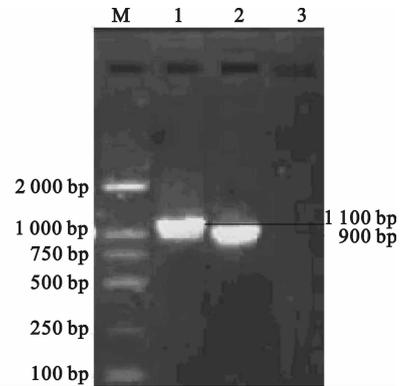


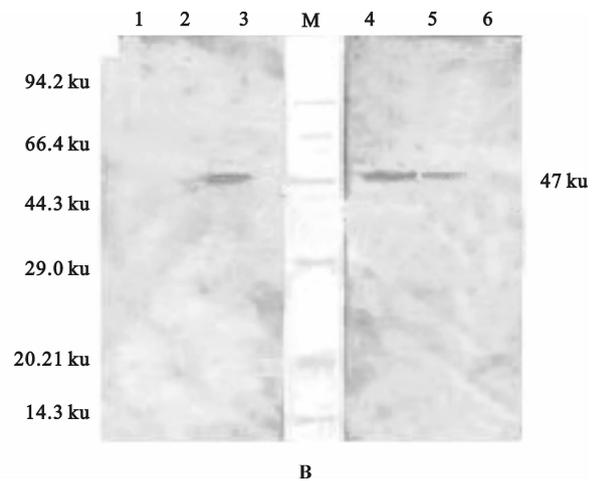
图 3 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 转染细胞的 RT-PCR 检测结果

M. DL 2 000;1. 转染 pSec Tag-E2qc 细胞的 RT-PCR 鉴定; 2. 转染 pSec Tag-E2sh 细胞的 RT-PCR 鉴定;3. 转染 pSec Tag2(A)细胞的 RT-PCR 鉴定

Fig. 3 RT-PCR identification of cells transfection pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh

M. DNA Marker DL 2 000;1. RT-PCR Products of pSec Tag-E2qc;2. RT-PCR Products of pSec Tag-E2sh; 3. RT-PCR Products of pSec Tag2(A)

达 E2 蛋白,但仅有去除 E2 蛋白跨膜序列的重组质粒,能够将表达的目的蛋白分泌到细胞培养上清液中。pSec Tag2(A)空载体(对照)无目的条带出现。



B

图 4 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE(A)和 Western-blot(B)检测结果
M. 蛋白 Marker;1. 转染 pSec Tag2(A)的细胞上清液;2. 转染 pSec Tag-E2qc 的细胞上清液;3. 转染 pSec Tag-E2sh 的细胞上清液;4. 转染 pSec Tag-E2sh 的细胞;5. 转染 pSec Tag-E2qc 的细胞;6. 转染 pSec Tag2(A)的细胞

Fig. 4 SDS-PAGE (A) and Western-blot (B) identification of transfection pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh

M. Protein Marker;1. Cells medium of pSec Tag2(A);2. Cells medium of pSec Tag-E2qc;3. Cells medium of pSec Tag-E2sh;4. Cells of pSec Tag-E2sh;5. Cells of pSec-E2qc 6. Cells of pSec Tag2(A)

3 讨 论

猪瘟病毒是影响养猪业最重要的病原体之一,严重影响我国养猪业的发展^[8]。尽管我国研制的兔化弱毒疫苗已经控制了猪瘟的大规模流行,但近年来猪瘟流行趋势的新特点,要求研究人员开发新的猪瘟疫苗。目前,关于猪瘟基因工程疫苗的研究很多,且国际上已有研制成功的猪瘟亚单位疫苗^[9-13]。有研究人员采用原核表达系统来研究亚单位疫苗,但是原核表达系统表达出的目标蛋白未经过加工修饰,合成的外源蛋白因折叠方式不正确、折叠效率低下,使得外源蛋白的活性比较低,不能反映目的蛋白的天然构象;此外原核表达系统表达的目的蛋白一般以包涵体的形式存在,蛋白的变性复性等工作操作起来比较麻烦^[14]。因此,发展在哺乳动物细胞中表达外源基因(尤其是本体动物细胞表达本体蛋白)的研究应运而生。用本体动物细胞表达病毒的抗原蛋白,表达的目的蛋白不仅能反映目的蛋白的天然构象,而且也能进行糖基化修饰,而且根据同源基因表达量增高的原理,也可以提高目的蛋白的表达量^[9]。为此,本试验在成功建立永生化猪脐静脉血管内皮细胞的基础上,应用分子生物学手段,将 CSFV E2 基因通过真核表达载体使其在猪脐静脉血管内皮细胞系成功表达。

由于 CSFV E2 蛋白的末端有跨膜区序列,导致 E2 蛋白的表达定位于表达细胞的细胞膜上,因此限制了蛋白的表达量^[15]。本试验选择 pSec Tag2(A) 真核表达载体,该载体含有小鼠 Ig k 链信号肽序列,在该信号肽序列的引导下,可将目的基因所表达的蛋白高效地分泌到细胞外。本试验成功构建了 pSec Tag-E2qc 和 pSec Tag-E2sh 真核表达载体,且去除跨膜区序列的 E2 蛋白能分泌到细胞培养上清液中,Western blot 结果显示,表达的目的蛋白反应原性很好,但对表达的目的蛋白量以及免疫猪后产生抗体的保护效果,仍需进一步试验证明。

[参考文献]

[1] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus [J]. *Virology*, 1987, 171(3):555-567.

[2] 朱良全, 彭 隼, 王 栋. 猪瘟疫苗研究进展及我国传统疫苗的研究现状 [J]. *中国兽药杂志*, 2005, 39(2):33-37.

Zhu L Q, Peng J, Wang D. The research progress on classical swine fever (CSF) vaccine [J]. *Chinese Journal of Veterinary*

Drug, 2005, 39(2):33-37. (in chinese)

[3] Moormann R J, Bouma A, Kramps J A, et al. Development of classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 73(2/3):209-219.

[4] Bouma A, De Smit A J, De Jong M C M, et al. Determination of the onset of the herd-immunity induced by the E2 subunit vaccine against classical swine fever virus [J]. *Vaccine*, 2000, 18:1374-1381.

[5] Hulst J K, Westra D F, Wenvoort G, et al. Glycoprotein E of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera [J]. *J Virol*, 1993, 67:5435-5442.

[6] 徐志文, 郭万柱, 石 谦, 等. 猪瘟病毒基因组及基因工程疫苗研究进展 [J]. *四川畜牧兽医*, 2005, 19(3):22-26.

Xu Z W, Guo W Z, Shi Q, et al. Research progress on the genome and genetic engineering vaccine of HCV [J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2005, 19(3):22-26. (in Chinese)

[7] Ahrens U, Kaden V, Drexler C, et al. Efficacy of the classic swine fever (CSF) marker vaccine *Porcilis Pesti* in pregnant sows [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 77(1/2):83-97.

[8] Wenvoort G C, Terpstra C, Bloemraad I, et al. Production of a against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis [J]. *Vet Microbiol*, 2001, 12:101-108.

[9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.

Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning* [M]. 3rd Edition. Translated by Huang P T, Wang J X, Zhu H C, et al. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)

[10] Robert A C, Zygmunt P. Evaluation of genetic vaccine against classical swine fever [J]. *Vaccine*, 2001, 19 (17/19): 2480-2484.

[11] 仇华吉, 童光志, 沈荣显. 猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世纪的回顾 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(8):1675-1685.

Qiu H J, Tong G Z, Shen R X. The lapinized Chinese strain of Classical Swine Fever Virus: A retrospective review spanning half a century [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(8):1675-1685. (in chinese)

[12] Sánchez O, Barrera M, Maria P, et al. Classical swine fever virus E2 glycoprotein antigen produced in adenovirally transduced PK-15 cells confers complete protection in pigs upon viral challenge [J]. *Vaccine*, 2008, 26:988-997.

[13] Greiser-Wilke I, Moennig V. Vaccine against classical swine fever virus: limitations and new strategies [J]. *Anim Health Res Rev*, 2004, 5:223-226.

[14] Dong X N, Chen Y H. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines [J]. *Vaccine*, 2006, 25:202-230.

[15] Risatti G R, Holinka L G, Sainz F, et al. N-linked glycosylation status of classical swine fever virus strain Brescia E2 glycoprotein influences virulence in swine [J]. *J Virol* 2007, 81:924-933.